

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07F 17/02, 17/00, G01N 33/48, C12Q 1/68, C12N 9/16, C07H 23/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/09337 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. März 1997 (13.03.97)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01681</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 6. September 1996 (06.09.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 195 33 093.5 7. September 1995 (07.09.95) DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE); Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): WIESSLER, Manfred [DE/DE]; Konstanzer Strasse 21, D-69120 Heidelberg (DE). SCHÜTTE, Dagmar [DE/DE]; Unterer Burggraben 18, D-69221 Dossenheim (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: METALLOCENE-PHOSPHORAMIDITE CONJUGATES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION AND THEIR USE</p> <p>(54) Bezeichnung: METALLOCEN-PHOSPHORAMIDIT-KONJUGATE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG SOWIE DEREN VERWENDUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns metallocene-phosphoramidite conjugates comprising one or a plurality of metallocenes and one or a plurality of phosphoramidites. The invention further concerns a process for preparing the metallocene-phosphoramidite conjugates and their use.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate, die ein oder mehrere Metallocene und ein oder mehrere Phosphoramidite aufweisen. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate sowie deren Verwendung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Verwendung.

Bisher gab es Schwierigkeiten Oligonukleotide und Teile von DNA bzw. RNA im Elektronenmikroskop zu detektieren bzw. zu differenzieren. Es gibt bisher keine zufriedenstellende Möglichkeit, DNA bzw. RNA in reproduzierbarer Weise elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen, um daran Studien durchführen zu können.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein Mittel bereitzustellen, mit dem durch einfache Veränderung der DNA bzw. RNA, möglichst schon bei der Synthese, ein Signal an der DNA bzw. RNA angebracht werden kann, um die DNA bzw. RNA besser elektronenmikroskopisch nachweisbar zu machen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale der Patentansprüche 1, 9, 12 und 14. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Bei dem erfindungsgemäßen Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat handelt es sich um Konjugate von einem oder mehreren Phosphoramiditen an ein oder mehrere Metallocene, bevorzugt Übergangsmetall-Metallocene, insbesondere Ferrocen, Ruthenocen oder Osmocen. Dabei können die in einem Konjugat vorkommenden Metallocene gleich oder verschieden sein. Zwischen dem Phosphoramidit und dem Metallocen befindet sich vorzugsweise noch ein Spacer, z.B. ein C₁-C₁₀-Alkyl-spacer, bevorzugt eine Propyl- oder Butylgruppe.

Bei dem erfindungsgemäßen Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat handelt es sich bevorzugt um Metallocenylalkyl-(2-cyanoethyl)-diisopropylamidophosphit, wobei das Metall ein Übergangsmetall ist, vorzugsweise Fe, Ru oder Os.

Das erfindungsgemäße Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat wird vorzugsweise im Rahmen der Oligonukleotidsynthese an ein Festphasen-gekoppeltes Oligomer addiert. Gute Ergebnisse werden erreicht, wenn das Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat im Vergleich zu den Oligonukleotiden im Überschuß eingesetzt wird. Bei der Oligonukleotidsynthese kommt es dann zu einer Metallocen-Markierung der DNA bzw. RNA, die elektronenmikroskopisch damit gut untersuchbar wird. Es ist natürlich auch möglich die DNA bzw. RNA nachträglich durch das Konjugat mit dem Metallocen zu markieren. Mit den metallocenmarkierten Oligonukleotiden lassen sich Feinstrukturen von DNA bzw. RNA im Elektronenmikroskop untersuchen. Antisense-Oligonukleotide können auf ihre Hybridisierungseigenschaften hin untersucht werden, es kann zwischen spezifischen und unspezifischen Bindungen unterschieden werden, die Doppel- oder Tripel-Helix-Bildung kann verfolgt werden. Bei bekannter Sequenz lassen sich Strukturen im Elektronenmikroskop der Sequenz zuordnen. Außerdem kann bei Markierung verschiedener Oligonukleotide mit unterschiedlichen Metallocenen eine bevorzugte Hybridisierung gemessen werden. Mittels der Elektronenverlustspektroskopie kann man dabei einzelne Metallatome anhand ihrer charakteristischen Elektronenspektren nachweisen.

Die Herstellung der Metallocen-Phosphoramidit-Konjugate erfolgt beispielsweise über ein Verfahren, dessen Reaktionsschema in Fig. 1 dargestellt ist: Ein Metallocen (Übergangsmetall, bevorzugt Ferrocen, Ruthenocen oder Osmocen) wird mit einem Dicarbonsäurechlorid oder -anhydrid unter der Katalyse eines Friedel-Crafts-Katalysators zur Metallocenoylalkylcarbonsäure (I) umgesetzt. Die Ketofunktion im Molekül wird danach unter geeigneten Bedingungen hydriert, z.B. Hydrierung unter Katalyse eines PtO₂-Katalysator (II). Die Carbonsäurefunktion im Molekül wird dann durch Umsetzung mit einem Alkohol verestert (III) und anschließend unter geeigneten Bedingungen, z.B. durch Umsetzung mit LiAlH₄, reduziert (IV). Den entstandenen Alkohol (IV) kann man mit einem Phosphoramiditderivat, z.B. dem in der

Oligonukleotidsynthese üblichen Chloro-N,N-diisopropylamino-cyanoethoxyphosphit (V), umsetzen. Das erhaltene Konjugat aus Metallocen und Phosphoramidit (VI) kann nun in der Oligonukleotidsynthese eingesetzt werden.

Die Markierung von (Oligo)nukleotiden während ihrer Synthese ist in Fig. 2 gezeigt. Das in Fig. 2 gezeigte Reaktionsschema ist beispielhaft für die durch die Umsetzung von Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat mit einem Nukleotid oder Oligonukleotid stattfindende Kopplung des (Oligo)nukleotids an das Metallocen. So wird das erfindungsgemäße Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat (VI) mit einem Festphasen-gekoppelten 5'-OH freien (Oligo)nukleotid mit einem Aktivator, z.B. Tetrazol, umgesetzt. Die entstehende Verbindung (VII) wird mit einem Oxidationsmittel, z.B. verdünnter Peroxidlösung, insbesondere 5%iger Cumolhydroperoxidlösung, umgesetzt, wobei eine Verbindung (VIII) entsteht. Unter Baseneinwirkung, z.B. Ammoniak, wird das an das Metallocen gekoppelte Nukleotid von der Festphase abgetrennt, wobei Verbindung (IX) entsteht.

Von den Erfindern wurde herausgefunden, daß die durch die Metallocene markierten (Oligo)nukleotide außer der guten Analysierbarkeit im Elektronenmikroskop eine andere interessante Anwendung haben, nämlich als künstliche Restriktionsenzyme. Es ist allgemein bekannt, daß im Körper Fremdstoffe durch Oxidation in eine wasserlösliche Form überführt werden. Das dafür benötigte Wasserstoffperoxid wird aus Sauerstoff zunächst durch Reduktion zu einem Superoxidanion (O_2^-) hergestellt. Dieses Anion kann mit Hilfe der Superoxid-Dismutase zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid disproportionieren. Sind Eisen(II)-Ionen vorhanden kann das intermediär entstehende H_2O_2 zu Hydroxylradikalen, die eine höchst reaktive Spezies darstellen, abreagieren. Findet diese Reaktion in der näheren Umgebung von DNA statt, kann die DNA ähnlich wie von einem Restriktionsenzym gespalten werden. Führt man die Spaltung künstlich herbei, fügt man ein Reduktionsmittel zu, z.B. Dithiothreitol (DTT), das aus dem Eisen (III) dann wieder Eisen (II) erzeugt, welches erneut reagieren kann. Ferrocen kann diese Reaktion als Eisen (II)-enthaltende Substanz auslösen. Wenn man ein Ferrocen-markiertes Oligonukleotid einsetzt, wird durch die Hybridisierung des Oligonukleotids gegen einzelsträngige

DNA (unter Bildung von Watson-Crick-Basenpaarung) oder auch doppelsträngige DNA (unter Bildung von Hoogsteen-Basenpaarung) das Eisen(II)-Ion in direkter Umgebung zur DNA an einer bestimmten Sequenz fixiert. Katalysiert dort das Eisen (II) die Spaltung von H₂O₂ kommt es durch die entstehenden reaktiven Hydroxylradikale bei der DNA an einer definierten Stelle zu einem Strangbruch. Idealerweise erfolgt dieses Schneiden nur an einer spezifischen Stelle der DNA. Das Beschriebene gilt natürlich anstelle von Eisen (II) auch für Ruthenium (II) und Osmium (III) in den jeweiligen Ruthenocenen und Osmocenen, sowie für alle Übergangsmetall-Metallocene, in denen das Übergangsmetall einfach durch Reduktion bzw. Oxidation in verschiedene Oxidationsstufen überführt werden kann.

Die Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die Figur erläutert:

Fig. 1: beispielhaftes Reaktionsschema für die Herstellung eines Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats

Fig. 2: Verwendung des Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats in der Oligosynthese zur Markierung von Oligonukleotiden mit Metallocenen

Die Erfindung wird nun weiter mit Bezug auf die nachfolgenden Beispiele beschrieben:

Beispiel 1: Herstellung von (5-Ferrocenylpentyl)-(2-cyanoethyl)-diisopropylamido-phosphit

a) 4-Ferrocenoylbutansäure (I)

Zu 3,5 g (26 mmol) Aluminiumtrichlorid in 100 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ wurde eine Mischung aus 5,0 g (27 mmol) Ferrocen und 2,3 g (20 mmol) Glutarsäureanhydrid in 100 ml CH₂Cl₂ getropft. Die Lösung färbt sich dabei violett. Nach 3 h unter Rückfluß wurde der Ansatz hydrolysiert und zur Entfernung von Reaktionsproduk-

ten, die weder in wässriger noch in organischer Phase löslich sind, durch eine Fritte gesaugt. Die wässrige Phase wurde anschließend abgetrennt und die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen, mit NaSO_4 getrocknet und eingeengt.

Ausbeute: 3,5 g (58,3 % d. Th.)

DC: R_f (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5): 0,6

SC: Alox, sauer (Akt. III), 1) CH_2Cl_2 ; 2) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1 + 5 Vol-% HOAc

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz) CDCl_3 : $\delta = 4,76\text{-}4,75$ (t, 2H, Cp subst.); 4,51-4,50 (t, 2H, Cp subst.); 4,19 (s, 5H, Cp unsubst.); 2,82-2,76 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-C(O)}$); 2,40-2,34 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-COO}$); 1,90-1,86 (m, 2H, C- $\text{CH}_2\text{-C}$)

MS: ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{FeO}_3$, 300,04), $m/z = 300$ (M^+ , 100 %)

b) **5-Ferrocenylpentansäure (II)**

2,0 g (6,66 mmol) 4-Ferrocenoylbutansäure (I) wurden in einem Dreihalskolben mit 50 ml Eisessig gelöst, der anschließend mit Stickstoff gespült wurde. 100 mg Platinoxid wurden als Katalysator zugefügt. Der Kolben wurde abermals mit Stickstoff gespült und dann mit Wasserstoff beladen. Nach 18 h ist die Hydrierung abgeschlossen und der Katalysator wird abgesaugt. Der Reaktionsansatz wird mit 100 ml H_2O verdünnt und 5x mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden noch 2x mit H_2O gewaschen, mit NaSO_4 getrocknet, eingeengt und chromatographiert..

Ausbeute: 1,91 g (98 % d. Th.)

DC: R_f , (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5): 0,65

SC: Alox, sauer (Akt.III), 1) CH_2Cl_2 ; 2) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 + 5 Vol-% HOAc

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz) CDCl_3 : $\delta = 4,08$ (s, 5H, Cp unsubst.); 4,03 (s, 4H, Cp subst.); 2,37-2,32 (m, 4H, Fc- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-COOH}$); 1,67-1,55 (m, 4H, 2x CH_2)

MS: ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{FeO}_2$, 286,07), $m/z = 286$ (M^+ , 100%); 199 (Fc- CH_2 , 31 %); 121 (FeCp, 40%)

c) **5-Ferrocenylpentansäureethylester (III)**

Zu 1 g (3,5 mmol) 5-Ferrocenylpentansäure (II) und 500 μ l Ethanol in THF wurde 1 g (4,8 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, der Reaktionsansatz eingeengt und ohne weiteres Aufarbeiten chromatographiert.

Ausbeute: 692 mg (63 % d. Th.)

DC: R_f (Kieselgel, CHCl₃); 0,8

SC: Alox, neutral (Akt.III), PE/EE 9:1

¹H-NMR (250 MHz) CDCl₃: δ = 4,17-4,10 (q, 2H, O-CH₂); 4,08 (s, 5H, CP unsubst.); 4,04-4,03 (m, 4H, Cp subst.); 2,37-2,28 (m, 4H, Fc-CH₂, CH₂-COO); 1,72-1,51 (m, 4H, 2x CH₂)

MS: (C₁₇H₂₂FeO₂, 314,09), m/z = 314 (M⁺, 32,6%); 206 (M⁺-Cp-OEt, 49,2 %); 163 (FeCp-CH₂-CH=CH₂, 83,6%), 55 (C₄H₇, 100 %)

d) **5-Ferrocenylpentanol (IV)**

Zu 0,5 g (160 mmol) 5-Ferrocenylpentansäureethylester (III) in 20 ml THF wurden 61 mg (1,60 mmol) LiAlH₄, gegeben und 2 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde hydrolysiert, es wurden 50 ml Dichlormethan zugegeben, mit 2 molarer Salzsäure neutralisiert und dreimal mit H₂O gewaschen, mit NaSO₄ getrocknet und eingeengt.

Ausbeute: 378 mg (89 % d.Th.)

DC: R_f(Alox, CH₂Cl₂) = 0,2

SC: Alox, neutr. (Akt.III), CH₂Cl₂

¹H-NMR (250 MHz) CDCl₃: δ = 4,08 (s, 5H, Cp unsubst.); 4,10-4,02 (m, 4H, Cp subst.); 3,68-3,61 (dt, 2H, CH₂-OH); 2,37-2,31 (m, 2H, Fc-CH₂), 1,65-1,49 (m, 4H, 2x CH₂); 1,45-1,35 (m, 2H, CH₂)

MS: (C₁₅H₂₀FeO, 272,08), m/z = 272 (M⁺, 100%); 199 (Fc-CH₂, 20,2 %); 121 (FeCp, 22,4 %)

e) (5-Ferrocenylpentyl)-(2-cyanoethyl)-diisopropylamidophosphit (VI)

0,150 g (0,55 mmol) des 5-Ferrocenylpentanols (IV) wurden zweimal mit THF eingeengt, mit 5ml THF aufgenommen und 376 μ l (2,2 mmol) Hünig-Base zugefügt. Zu dieser Reaktionsmischung wurden 195 μ l (0,83 mmol) Chloro-N,N-diisopropylamino-cyanoethoxyphosphin (V) mit Hilfe einer Spritze über ein Septum zugetropft. Nach 15 min bei RT wurden 50 μ l H₂O zugegeben und weitere 30 Minuten gerührt. Der Ansatz wurde in 20 ml EE/NEt₃ aufgenommen und mit 10 % NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt, anschließend 2 x mit Wasser gewaschen, mit NaSO₄ getrocknet und eingeengt.

Ausbeute: 164 mg (94 % d.Th.)

DC: R_f(Alox, CH₂Cl₂) = 0,61

SC: KG, PE/EE/NEt₃ 18:1:1

¹H-NMR (250 MHz) CDCl₃: δ = 4,08 (s, 5H, Cp unsubst.); 4,04-4,02 (m, 4H, Cp subst.); 3,89-3,75 (2x sep, je 1H, NCHMe₂); 3,70-3,52 (m, 4H, CH₂-Cyanoethyl, 5"-H₂); 2,65-2,60 (t, 2H, CH₂-CN); 2,36-2,30 (m, 2H, 1"-H₂); 1,68-1,35 (m, 6H, 3x CH₂); 1,20-1,16 (4x s, je 3H, 4x CH₃)

MS: (C₂₄H₃₇FeN₂O₂P, 472,19), m/z = 472 (M⁺, 14,4 %); 389 (M⁺-N(CH(CH₃)₂-CN, 63,0 %); 121 (FeCp, 100 %)

Beispiel 2: Markierung von Oligonukleotiden mit Ferrocen

a) (5-Ferrocenylpentyl)-(2-cyanoethyl)-(3'-O-acetyl-2'-desoxythymidin-5')-phosphitriester (VII)

50 mg (0,18 mmol) 3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin und 20 mg (0,29 mmol) Tetrazol wurden zweimal mit 5 ml wasserfreiem CH₃CN eingeengt und mit 5 ml CH₃CN aufgenommen. Dazu wurden langsam 100 mg (0,21 mmol) des Phosphoramidites (VI) in 10 ml CH₃CN getropft, welches zuvor ebenfalls zweimal mit CH₃CN eingeengt worden war. Nach einer Stunde Röhren bei RT wurden dem Ansatz 100 ml PE/EE 9:1 zugefügt, mit 10 % NaHCO₃-Lösung, 2x mit H₂O gewaschen und eingeengt.

Ausbeute: 103 mg (88 % d.Th.)

DC: R_f(KG, CHCl₃/MeOH 95/5) = 0,5

SC: KG, CHCl₃/MeOH/NEt₃ 98/1/1

b) Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(3'-O-acetyl-2'-desoxythymidin-5')-phosphat (VIII)

103 mg (0,15 mmol) des Phosphitesters (VII) wurden mit 1 ml einer 5 % Cumol-hydroperoxid-Lösung in CH₃CN versetzt. Nach 3 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100µl Isopropanol gestoppt. Der Ansatz wurde mit 1 ml Triethylamin versetzt und ohne weiteres Aufarbeiten vorsichtig eingeengt und sofort chromatographiert. Die Cyanoethoxy-Gruppe wird dabei durch das Triethylanim abgespalten.

Ausbeute: 104 mg (93 % d.Th.)

DC: R_f(KG, CHCl₃/MeOH 95/5) = 0,2

SC: KG, CHCl₃/MeOH/NEt₃ 98 1/1

¹H-NMR (250 MHz) CDCl₃: δ = 7,77 (q, 1H, 6-H); 6,29-6,24 (dd, 1H, 1'-H); 5,29-5,28 (dt, 1H, 3'-H); 4,12-4,08 (m, 2H, Cp subst.); 4,06 (s, 5H, Cp unsubst.); 4,05-3,98 (m, 5H, Cp subst., 4'H, 5'H₂); 3,84-3,76 (dt, 2H, 5"-H₂); 2,32-2,22 (m, 4H, 2'-H, 1"-H₂); 2,03 (s, 3H, C(O)CH₃); 1,84 (d, 3H, 5-CH₃); 1,66-1,42 (m, 6H, 3xCH₂) J_{5-Me,6} = 1,18; J_{1',2'} = 6,53; J_{5',P} = 6,45; J_{6',P} = 6,45

c) Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-2'-desoxythymidin-5'-phosphat (IX)

Der Phosphatdiester (VIII) wurde mit 1 ml MeOH/H₂O/NEt₃ 4:2:1 versetzt. Nach einer halben Stunde wurde der Ansatz eingeengt, zweimal mit Ethanol aufgenommen und erneut eingeengt.

¹H-NMR (250 MHz) CDCl₃: δ = 7,66 (q, 1H, 6-H); 6,21-6,16 (dd, 1H, 1'-H); 4,40-4,35 (m, 1H, 3'-H); 4,22-4,20 (dd, 2H, Cp subst.); 4,10-3,87 (m, 7H, Cp subst., 4'H, 5'-H₂); 4,06 (s, 5H, Cp unsubst.); 3,81-3,73 (dt, 2H, 6"-H₂); 2,33-2,27 (m,

2H, 1"-H₂); 2,18-2,11 (m, 2H, 2'-H); 1,85 (d, 3H, 5-CH₃); 1,66-1,44 (m, 4H, 2xCH₂); 1,43-1,28 (m, 2H, CH₂)
 $J_{5\text{-Me},6} = 1,22$; $J_{1',2'} = 6,55$; $J_{5',p} = 6,53$

Beispiel 3: Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxynukleosid-5')-phosphate an der Festphase

Die Säulen mit der Festphase enthalten in der Regel 0,2 µmol eines Nukleosides. In diesem Fall jedoch wurden Festphasen mit der Beladung 1µmol gewählt, um eine spektroskopische Untersuchung zu ermöglichen. Die Säulen die in der automatisierten Oligonukleotidsynthese verwendet werden, sind so beschaffen, daß man auf beiden Seiten eine Luer-Spritze aufsetzen kann. Man kann so die Säule mit den gewünschten Reaktionspartnern oder Lösungsmitteln spülen, indem man sie von einer Spritze in die andere drückt. Die Festphasensynthese wurde mit allen vier Desoxynukleosiden durchgeführt:

1. Abspalten der Dimethoxytritylschutzgruppe: 2x je 1 ml 3% Dichloressigsäure in Dichlormethan für 1 min
2. Spülen mit dem Abspaltungsreagenz bis das Eluat farblos ist
3. Spülen mit mindestens 5x1 ml Dichlormethan, zum Entfernen jeglicher Säurespuren
4. Restliches Lösungsmittel an der Wasserstrahlpumpe bis zur Trockene abziehen
5. Belüften mit Argon
6. Kopplung: 180 µl einer Tetrazol-Lösung (35 mg/ml) in Acetonitril und 23,6 mg (50 µmol) des Phosphoramidites (VI) in 500 µl Acetonitril werden gemischt und sofort auf die Festphase gegeben. Nach 3 min wird das Reaktionsgemisch grob ausgespült und der Vorgang wiederholt.
7. Spülen mit mindestens 5x 1 ml Acetonitril
8. Oxidation: 1 ml einer 5% Cumolhydroperoxid in Acetonitril für 2 min
9. Spülen mit mindestens 5x 1 ml Acetonitril
10. Abziehen des restlichen Lösungsmittels an der Wasserstrahlpumpe

10

11. Festphase mit 1 ml einer konzentrierten Ammoniak/Methylamin-Lösung (jeweils ca. 10-30%) 5 min inkubieren
12. Lösung in ein verschraubbares Eppendorf-Reaktionsgefäß spülen und für 1 h bei 55°C inkubieren.

Ansließend wird der Reaktionsansatz am Lyophilisator und zur Weiterverarbeitung mit 1 ml TEAA/CH₃CN 1:1 aufgelöst.

Verbin-dung	λ_{max} Fc-dN [nm]	λ_{max} dNMP ¹ [nm]	Rt-Zeit ² [min]	OD	Ausbeute [%]
Fc-dT	264	267	33	2,28	23,7
Fc-dC	270	271	31	2,78	30,5
Fc-dG	252	252	24	3,85	28,8
Fc-dA	257	259	34	2,17	14,1

¹nach Maniatis, Sambrook, 1989

²Die HPLC wurde auf einer präparativen RP₁₈-Säule durchgeführt. Fluß 4 ml/min, 25 %-75% B in 40 min, A: 90 % TEAA/10 % CH₃CN, B: 10 % TEAA/90 % CH₃CN

Die Absorption des Ferrocens ist bei dieser geringen Menge zu vernachlässigen. Zur Berechnung der Ausbeute wurden die Absorptionswerte für die entsprechenden dNMPs herangezogen.

Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxythymidin-5')-phosphat

MS (ESI): (C₂₅H₃₃FeN₂O₃P, 576,16): m/z = (575,1 [M-H]); (449,0 [M-Thymin-H]⁺); (383,0 [M-Thymin-Cp-H]); (351,1 [Fc-(CH₂)₅-O-PO₃])); (285,1 [CpFe-(CH₂)₅-O-PO₃]);

(125,2 [Thymin-H])

Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxycytidin-5')-phosphat

MS (ESI): ($C_{24}H_{32}FeN_3O_7P$, 561,13); m/z = (560,1 [M-H]);

Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxyguanosin-5')-phosphat

MS (ESI): ($C_{25}H_{32}FeN_5O_7P$, 601,14); m/z = (600,1 [M-H]);

Triethylammonium-(5-ferrocenylpentyl)-(2'-desoxyadenosin-5')-phosphat

MS (ESI): ($C_{25}H_{32}FeN_5O_6P$, 585,14); m/z = (584,1 [M-H]); (448,8, [M-Adenin-H]); (383,1 [M-Adenin-Cp-H]); (350,9 [Fc-(CH₂)₅-O-PO₃])(285,1[CpFe-(CH₂)₅-O-PO₃])); (134,2 [Adenin-H]) (586,0 [M + H]⁺) (352,1 [Fc-(CH₂)₅-O-PO₃ + H]⁺); (136,2 [Adenin + H]⁺)

Ferrocenylverknüpftes 4-mer

Die Sequenz ^{5'}TGAC^{3'} wurde mit der automatisierten Oligonukleotidsynthese (1 μ mol) hergestellt. Die Dimethoxytrityl-Gruppe am Ende des letzten Nukleotids wurde dann von Hand abgespalten und weiterhin so verarbeitet wie auch die Monomere. Die präparative HPLC wurde unter geänderten Bedingungen durchgeführt.

HPLC: RP₁₈-Säule, Fluß 4 ml/min, 10 %-50 % B in 40 min und 10 min bei 50 %, A: 90 % TEAA/10 % CH₃CN, B: 10 % TEAA/ 90 % CH₃CN

Retentionszeit 4-mer: 43 min

MS (ESI): ($C_{54}H_{69}FeN_{15}O_{25}P_{49}$, 1507,28); m/z = (1506,9 [M-H]; (1064,5 [M-Cytidin-CpFe-OH]); (619,0 [pApC]))

Ferrocenylverknüpftes 27-mer

Das 27-mer mit der Sequenz

^{5'}TTC CTC CTT CCT TCC TTC CTT CCT CCC^{3'}

wurde am Oligonukleotidsynthesizer hergestellt und das Ferrocen mit der Hand analog zu den Monomeren und dem 4-mer addiert.

12

Die Analytik mit Hilfe der HPLC lief unter den gleichen Bedingungen wie bei dem
4-mer:

Retentionszeit Ferrocenylverknüpftes 27-mer: 35,3 min

Patentansprüche

- 1) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat, dadurch gekennzeichnet, daß es ein oder mehrere Metallocene und ein oder mehrere Phosphoramidite aufweist.
- 2) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das oder die Metallocene über einen Spacer an das oder die Phosphoramidite gebunden sind.
- 3) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallocen ein Übergangsmetall-Metallocen ist.
- 4) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallocen Ferrocen, Ruthenocen oder Osmocen ist.
- 5) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Spacer eine C₁ - C₁₀ Alkylgruppe ist.
- 6) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die in dem Konjugat vorhandenen Metallocene gleich oder verschieden sind.
- 7) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Phosphoramidit-Bestandteil aus der Verbindung Chloro-N,N-diisopropylamino-cyanoethoxyphosphit stammt.
- 8) Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Metallocen-Phosphoramidit-Konjugat um Metallocen-ylalkyl-(2-cyanoethyl)-diisopropylamidophosphithandelt, wobei das Metall ein Übergangsmetall, insbesondere Eisen, Ruthenium oder Osmium ist.

9) Verfahren zur Herstellung eines Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Schritte aufweist:

- a) Umsetzung eines Metallocens mit einem Dicarbonsäureanhydrid oder -chlorid zu einer Metallocenoylalkylcarbonsäure (I),
- b) Reduktion der in Schritt a) erhaltenen Verbindung zu einem Alkohol,
- c) Umsetzung des in Schritt b) erhaltenen Alkohols mit einem Phosphoramiditderivat unter Erhalt des Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats.

10) Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallocen ein Übergangsmetall-Metallocen ist, insbesondere Ferrocen, Ruthenium oder Osmium ist.

11) Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das in Schritt c) verwendete Phosphoramiditderivat Chloro-N,N-diisopropylamino-cyanoethoxyphosphit ist.

12) Verwendung eines Metallocen-Phosphoramidit-Konjugats zur elektronenmikroskopisch detektierbaren Markierung von Oligonukleotiden bzw. DNA bzw. RNA.

13) Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung während der Oligonukleotidsynthese stattfindet.

14) Verwendung von Metallocen-markierten Oligonukleotiden als künstliche Restriktionsenzyme.

FIG. 1

1/2

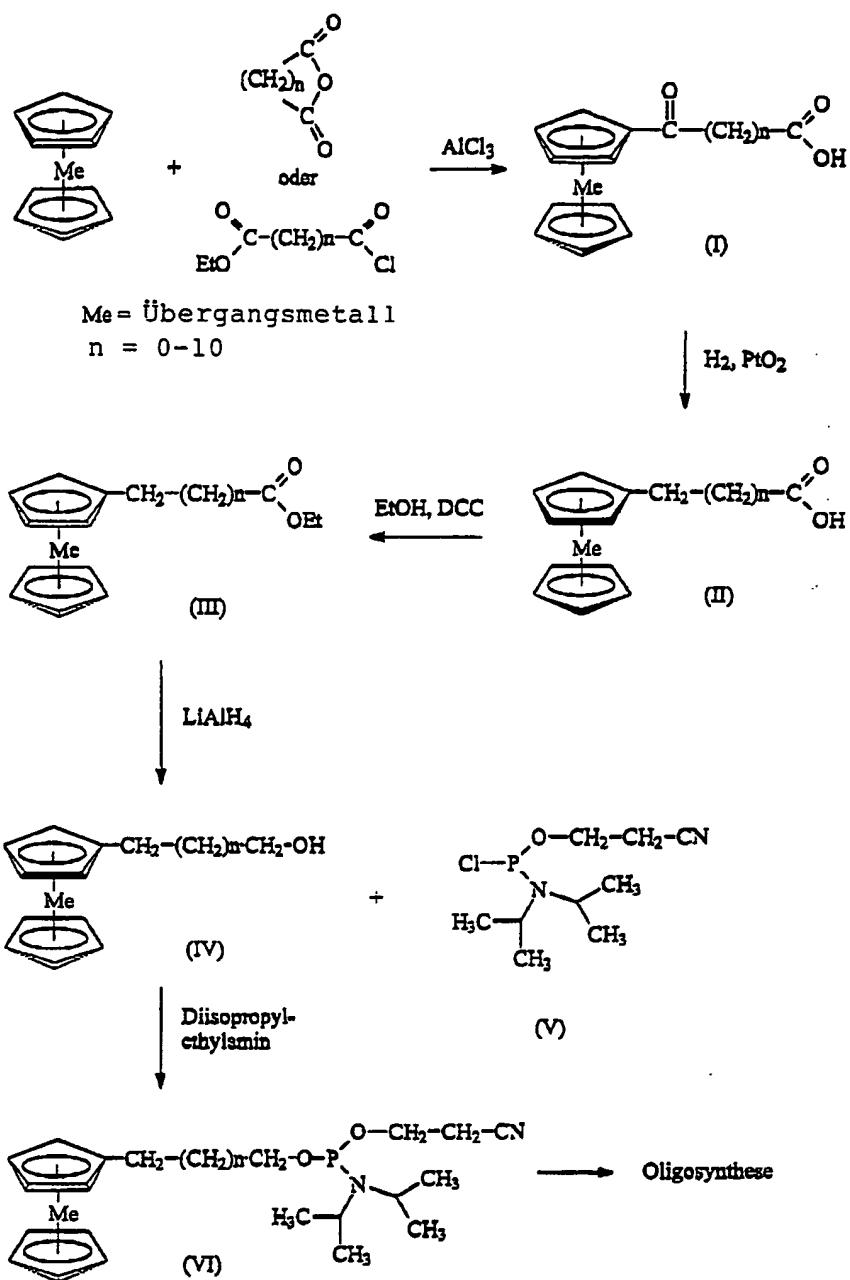
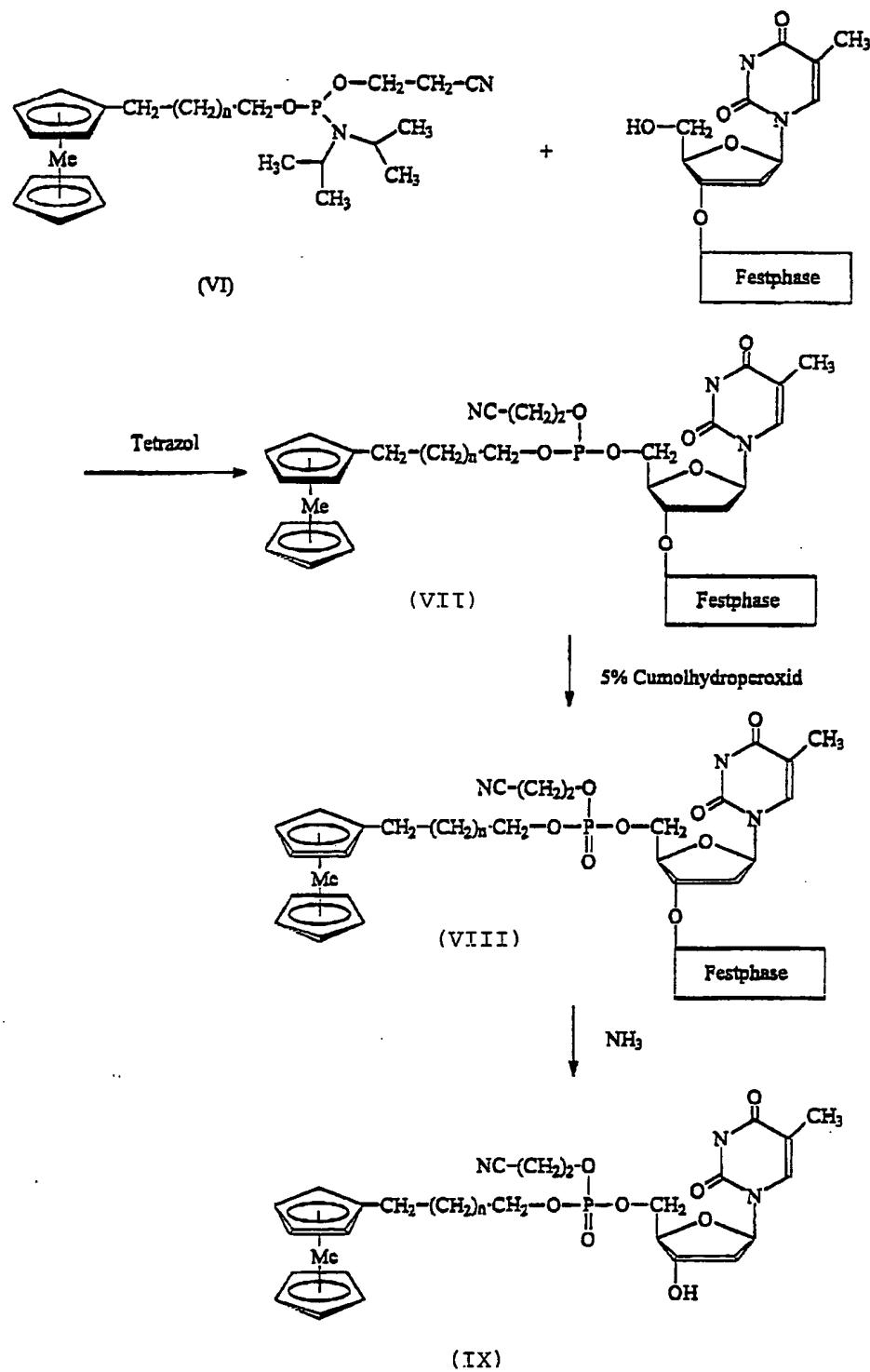


FIG. 2

2/2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PL./DE 96/01681

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6	C07F17/02	C07F17/00	G01N33/48	C12Q1/68	C12N9/16
	C07H23/00				

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07F G01N C12Q C12N C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>CHEMICAL COMMUNICATIONS, no. 4, 1996, pages 555-557, XP002022094 MUCIC, R.C. ET AL.: "synthesis and characterization of dna with ferrocenyl groups attached to their 5'-termini: electrochemical characterization of a redox-active nucleotide monolayer" see the whole document</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-8

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

3 January 1997

Date of mailing of the international search report

31.01.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Rinkel, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/01681

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 11, 12 September 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 134702f, DEBITSUDO, A.: "preparation of oligonucleotide having redox group" XP002022095 see abstract & JP 06 041 184 A (MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES) 15 February 1994 -----	1-8
X		1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PL./DE 96/01681

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES	IPK 6 C07F17/02 C07F17/00 G01N33/48 C12Q1/68 C12N9/16
	C07H23/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07F G01N C12Q C12N C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>CHEMICAL COMMUNICATIONS, Nr. 4, 1996, Seiten 555-557, XP002022094 MUCIC, R.C. ET AL.: "synthesis and characterization of dna with ferrocenyl groups attached to their 5'-termini: electrochemical characterization of a redox-active nucleotide monolayer" siehe das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-8

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *' A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *' E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *' L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *' O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *' P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *' T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *' X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kam allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *' Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kam nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *' &" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

3.Januar 1997

31.01.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rinkel, L

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen PL./DE 96/01681

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 11, 12.September 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 134702f, DEBITSUDO, A.: "preparation of oligonucleotide having redox group" XP002022095 siehe Zusammenfassung & JP 06 041 184 A (MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES) 15.Februar 1994 -----	1-8
X		1-8

1